



|   |           |  |
|---|-----------|--|
| <p>(51) 国際特許分類6<br/>G01N 33/542</p>   | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号<br/>WO99/13332</p> <p>(43) 国際公開日<br/>1999年3月18日(18.03.99)</p>   |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03988</p> <p>(22) 国際出願日 1998年9月4日(04.09.98)</p> <p>(30) 優先権データ<br/>特願平9/240672 1997年9月5日(05.09.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)<br/>松下電器産業株式会社<br/>(MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.)[JP/JP]<br/>〒571-8501 大阪府門真市大字門真1006番地 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)<br/>中山 浩(NAKAYAMA, Hiroshi)[JP/JP]<br/>〒573-1114 大阪府枚方市東山2-24-107 Osaka, (JP)<br/>宮崎仁誠(MIYAZAKI, Jinsei)[JP/JP]<br/>〒578-0901 大阪府東大阪市加納7-25-2-704 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人<br/>弁理士 山本秀策(YAMAMOTO, Shusaku)<br/>〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号<br/>クリスタルタワー15階 Osaka, (JP)</p>                                    |           | <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類<br/>国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: FLUORESCENCE POLARIZATION METHOD</p> <p>(54)発明の名称 蛍光偏光法</p> <div data-bbox="337 1268 1349 1738"> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>A fluorescence polarization method for analyzing an object contained in samples. This method involves: (a) the step of providing a fluorescence-labeled protein comprising a protein binding specifically to the object and a fluorochrome covalently bonded thereto; (b) the step of bonding the fluorescence-labeled protein to the object; and (c) the step of measuring a change in the extent of fluorescence polarization of the fluorescence-labeled protein having the object bonded thereto.</p> |           |  |

(57)要約

試料中の測定対象物を分析するための蛍光偏光法が提供される。この蛍光偏光法は、(a)測定対象物に特異的に結合するタンパク質と蛍光色素とが共有結合した蛍光標識タンパク質を提供する工程、(b)蛍光標識タンパク質を測定対象物と結合させる工程、および(c)測定対象物が結合した蛍光標識タンパク質の蛍光偏光度変化を測定する工程、を包含する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|    |              |    |           |    |                |    |            |
|----|--------------|----|-----------|----|----------------|----|------------|
| AL | アルバニア        | FI | フィンランド    | LK | スリ・ランカ         | SI | スロヴェニア     |
| AM | アルメニア        | FR | フランス      | LR | リベリア           | SK | スロヴァキア     |
| AT | オーストリア       | GA | ガボン       | LS | レソト            | SL | シエラ・レオネ    |
| AU | オーストラリア      | GB | 英国        | LT | リトアニア          | SN | セネガル       |
| AZ | アゼルバイジャン     | GD | グレナダ      | LU | ルクセンブルグ        | SZ | スワジランド     |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア      | LV | ラトヴィア          | TD | チャード       |
| BB | バルバドス        | GH | ガーナ       | MC | モナコ            | TG | トーゴ        |
| BE | ベルギー         | GM | ガンビア      | MD | モルドヴァ          | TJ | タジキスタン     |
| BF | ブルキナ・ファソ     | GN | ギニア       | MG | マダガスカル         | TM | トルクメニスタン   |
| BG | ブルガリア        | CW | ギニア・ビサウ   | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR | トルコ        |
| BJ | ベナン          | GR | ギリシャ      |    | 共和国            | TT | トリニダード・トバゴ |
| BR | ブラジル         | HR | クロアチア     | ML | マリ             | UA | ウクライナ      |
| BY | ベラルーシ        | HU | ハンガリー     | MN | モンゴル           | UG | ウガンダ       |
| CA | カナダ          | ID | インドネシア    | MR | モーリタニア         | US | 米国         |
| CF | 中央アフリカ       | IE | アイルランド    | MW | マラウイ           | UZ | ウズベキスタン    |
| CG | コンゴ          | IL | イスラエル     | MX | メキシコ           | VN | ヴェトナム      |
| CH | スイス          | IN | インド       | NE | ニジェール          | YU | ユーゴスラビア    |
| CI | コートジボアール     | IS | アイスランド    | NL | オランダ           | ZW | ジンバブエ      |
| CM | カメルーン        | IT | イタリア      | NO | ノルウェー          |    |            |
| CN | 中国           | JP | 日本        | NZ | ニュージーランド       |    |            |
| CU | キューバ         | KE | ケニア       | PL | ポーランド          |    |            |
| CY | キプロス         | KG | キルギスタン    | PT | ポルトガル          |    |            |
| CZ | チェッコ         | KP | 北朝鮮       | RO | ルーマニア          |    |            |
| DE | ドイツ          | KR | 韓国        | RU | ロシア            |    |            |
| DK | デンマーク        | KZ | カザフスタン    | SD | スーダン           |    |            |
| EE | エストニア        | LC | セントルシア    | SE | スウェーデン         |    |            |
| ES | スペイン         | LI | リヒテンシュタイン | SG | シンガポール         |    |            |

明細書  
蛍光偏光法

技術分野

- 5      本発明は、試料中の測定対象物を分析するための蛍光偏光法に関する。本発明は特に、試料中の細菌またはウイルスを分析するために有用な蛍光偏光法に関する。本発明は、医療診断、環境測定ならびに食中毒および感染症に関連する食品管理の分野において有用である。

10    背景技術

試料中の物質を測定する方法の1つとして、蛍光偏光法が知られている。この方法は、蛍光標識した化合物を直線偏光によって励起した場合、化合物から放出される蛍光がその分子量に比例した大きさの偏光度を有する原理に基づくものである。

- 15    従来、開発された蛍光偏光法として、抗原抗体反応に基づく蛍光偏光免疫測定法がある。

- 例えば、米国特許第4902630号は、C反応性タンパク質（CRP）に蛍光色素であるフルオレセインを結合させた「トレーサー」（6）とCRPに特異的に結合する抗体（4）とを混合した溶液に、測定対象物としてのCRP（5）を含む体液  
20    （特に、血液）を添加する方法を開示する。混合溶液中での抗体（4）に対するトレーサー（6）とCRP（5）との競合に基づいて、試料中のCRP（5）が測定される（測定原理の概念図を図8に示す。）。しかし、この測定系は競合反応に基づくため、二段階の結合反応が必要であり、測定操作が煩雑である。さらに、測定に使用されたフルオレセインは、蛍光寿命が短いため、高分子量の物質の測定に  
25    は適用が困難である。

特願昭62-38363号は、免疫学的反応を利用した抗原または抗体の測定のための免疫学的測定装置を開示する。その測定の際には、蛍光で標識した抗体を使用し得ることが教示される。しかし、測定の具体的な態様についての記載はない。測定対象物としては、血液中の治療薬剤（例えば、ジゴキシン）などの、共存する

タンパク質に比べて明らかに低分子量の物質のみが考慮されている。

それゆえ、測定反応系が単純であり、測定操作が簡便な蛍光偏光法であって、特に高分子量の物質の測定に適した蛍光偏光法の開発が望まれていた。

## 5 発明の開示

本発明の目的は、試料中に含まれる測定対象物を、その蛍光偏光度変化を測定することにより分析するための蛍光偏光法であって、特に高分子量の物質の測定に適した蛍光偏光法を提供することである。本発明の他の目的は、蛍光偏光法を利用して試料中に含まれる測定対象物を分析するための試薬を提供することである。

10 る。

本発明は、試料中の測定対象物を分析するための蛍光偏光法であって、次の工程：(a)測定対象物に特異的に結合する抗体、レセプターまたはインヒビターであるタンパク質と、蛍光色素とが共有結合した蛍光標識タンパク質を提供する工程、(b)上記蛍光標識タンパク質を測定対象物と結合させる工程、および(c)測定対象物が結合した蛍光標識タンパク質の蛍光偏光度変化を測定する工程、を包含する蛍光偏光法に関する。

上記方法において、測定対象物に特異的に結合する抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、Fab抗体または(Fab)<sub>2</sub>抗体であり得る。

上記方法において、上記測定対象物は、生体内物質、細菌を含む微生物、ウイルス、医薬品、環境汚染物質または乱用薬物であり得る。生体内物質は、ペプチド、タンパク質、脂質、糖類または核酸類であり得る。生体内物質としてのタンパク質は、50万以上の分子量を有し得る。

上記生体内物質としてのタンパク質は、抗体、ホルモン、炎症マーカー、凝固因子、アポリポタンパク質、高密度リポタンパク質(HDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン、ヘモグロビン、ガンマ

25 ーカまたは酵素であり得る。  
上記ホルモンは、絨毛性性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体ホルモン、濾胞形成ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモンまたはインシュリンであり得る。

上記炎症マーカーは、C反応性タンパク質（CRP）、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン（ $\alpha$ 1-AT）、 $\alpha$ 1-アンチキモトリプシン（ $\alpha$ 1-X）、 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質（ $\alpha$ 1-AG）、ハプトグロビン（Hp）、セルロプラスミン（Cp）、補体第9成分（C9）、補体第4成分（C4）、補体第3成分（C3）、補体B因子（B）、フィブリノーゲン（Fbg）、血清アミロイドA（SAA）、C1インヒビター（C1I）、シアロ糖タンパク質（すなわち、シアル酸が結合した糖タンパク質）、酸可溶性タンパク質（ASP）または免疫抑制酸性タンパク質（IAP）であり得る。

本発明はまた、試料中の測定対象物を分析するための蛍光偏光法に使用するための試薬であって、測定対象物に特異的に結合する抗体、レセプターまたはインヒビターであるタンパク質と、蛍光色素とが共有結合した蛍光標識タンパク質を含む試薬に関する。

本発明はさらに、試料中の細菌またはウイルスを分析するための蛍光偏光法であって、次の工程：(a)細菌またはウイルスに特異的に結合する抗体と蛍光色素とが共有結合した蛍光標識抗体を提供する工程、(b)蛍光標識抗体を細菌またはウイルスと結合させる工程、および(c)細菌またはウイルスが結合した蛍光標識抗体の蛍光偏光度変化を測定する工程、を包含する蛍光偏光法に関する。

上記方法において、上記抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、Fab抗体または(Fab)<sub>2</sub>抗体であり得る。

上記方法において、上記細菌は、Rhodospirillaceae（ロドスピリルム）、Chromatiaceae（クロマチア）、Chlorobiaceae（クロロビウム）、Myxococcaceae（ミクソコッカス）、Archangiaceae（アルカンギウム）、Cystobacteraceae（シストバクター）、Polyangiaceae（ポリアンギウム）、Cytophagaceae（サイトファーガ）、Beggiatoaceae（ベギアトア）、Simonsiellaceae（シモンシエラ）、Leucotrichaceae（リユーコトリックス）、Achromatiaceae（アクロマチウム）、Pelonemataceae（ペロネーマ）、Spirochaetaceae（スピロヘータ）、Spirillaceae（スピリルム）、Pseudomonadaceae（シュードモナス）、Azotobacteraceae（アゾトバクター）、Rhizobiaceae（リゾビウム）、Methylomonadaceae（メチロモナス）、Halobacteriaceae（ハロバクテリウム）、Enterobacteriaceae

ae (腸内細菌)、Vibrionaceae (ヴィブリオ)、Bacteroidaceae (バクテロイデ  
ス)、Neisseriaceae (ナイセリア)、Veillonellaceae (ヴェイヨネラ)、Orga  
nisms oxidizing ammonia or nitrite (アンモニアまたは亜硝酸化細菌)、Org  
anisms metabolizing sulfur and sulfur compounds (硫黄代謝細菌)、Organis  
ms depositing iron and/or manganese oxides (酸化鉄および/または) 酸化マ  
ンガン沈着細菌)、Siderocapsaceae (シデロカプサ)、Methanobacteriaceae  
(メタノバクテリウム)、Aerobic and/or facultatively anaerobic (好気性お  
よび/または通性嫌気性) Micrococcaceae (マイクロコッカス)、Streptococcace  
ae (ストレプトコッカス)、Anaerobic (嫌気性) Peptococcaceae (ペプトコッ  
カス)、Bacillaceae (バチルス)、Lactobacillaceae (乳酸桿菌)、Corynefor  
m group of bacteria (コリネフォルム細菌)、Propionibacteriaceae (プロピ  
オン酸菌)、Actinomycetaceae (アクチノミセス)、Mycobacteriaceae (マイコ  
バクテリウム)、Frankiaceae (フランキア)、Actinoplanaceae (アクチノブラ  
ーネス)、Dermatophilaceae (デルマトフィルス)、Nocardiaceae (ノカルディ  
ア)、Streptomycetaceae (ストレプトミセス)、Micromonosporaceae (ミクロ  
モノスポラ)、Rickettsiaceae (リケッチア)、Bartonellaceae (バルトネラ)、  
Anaplasmataceae (アナプラズマ)、Chlamydiaceae (クラミディア)、Mycoplas  
mataceae (マイコプラズマ)、およびAcholeplasmataceae (アコレプラズマ) か  
らなる群から選択される細菌であり得る。

上記方法において、上記ウイルスは、Enterovirus (エンテロウイルス)、Car  
diovirus (カルディオウイルス)、Rhinovirus (ライノウイルス)、Aphthoviru  
s (アフトウイルス)、Calicivirus (カリシウイルス)、Orbivirus (オルビウ  
イルス)、Reovirus (レオウイルス)、Rotavirus (ロータウイルス)、Abibirn  
avirus (アビビルナウイルス)、Piscibirnavirus (ピスチビルナウイルス)、E  
ntomobirnavirus (エントモビルナウイルス)、Alphavirus (アルファウイル  
ス)、Rubivirus (ルビウイルス)、Pestivirus (ペスティウイルス)、Flavivi  
rus (フラヴィウイルス)、Influenzavirus (インフルエンザウイルス)、Pneum  
ovirus (ニューモウイルス)、Paramyxovirus (パラミクソウイルス)、Morbill  
ivirus (モルビリウイルス)、Vesiculovirus (ベシクロウイルス)、Lyssaviru

s (リッサウイルス)、Coronavirus (コロナウイルス)、Bunyavirus (ブンヤウイルス)、Arenavirus (アレナウイルス)、Human immunodeficiency virus (エイズウイルス)、Hepatitis A virus (A型肝炎ウイルス)、Hepatitis B virus (B型肝炎ウイルス)、およびHepatitis C virus (C型肝炎ウイルス) からなる群から選択されるウイルスであり得る。

本発明の蛍光偏光法において、蛍光色素は、一級～三級アミノ基、カルボキシ基、チオール基、フェニル基、フェノール基またはヒドロキシ基に結合し得る官能基を有し得る。蛍光色素の蛍光寿命は、10ナノ秒から200ナノ秒の間にあり得る。蛍光色素は、ローダミン、ピレン、ジアルキルアミノナフタレン、またはシアニンの骨格を有し得る。

本発明はまた、試料中の細菌またはウイルスを分析するための蛍光偏光法に使用するための試薬であって、測定対象物に特異的に結合する抗体と蛍光色素とが共有結合した蛍光標識抗体を含む試薬に関する。

#### 15 図面の簡単な説明

図1は、蛍光標識抗体を使用する場合の、本発明の原理を表す概念図である。

図2は、サクシンイミジル-L-ピレンブタン酸の合成経路を示す図である。

図3は、蛍光色素による抗体の標識を表す概念図である。

図4は、本発明の蛍光偏光法を使用したC反応性タンパク質 (CRP) の測定結果を示すグラフである。

図5は、本発明の蛍光偏光法を使用した高密度リポタンパク質 (HDL) の測定結果を示すグラフである。

図6は、本発明の蛍光偏光法を使用した低密度リポタンパク質 (LDL) の測定結果を示すグラフである。

図7は、本発明の蛍光偏光法を使用したE. coli 0157の測定結果を示すグラフである。

図8は、従来の蛍光偏光法の測定原理を表す概念図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の方法における測定系では、測定対象物と特異的に結合する抗体、レセプター、またはインヒビターであるタンパク質が蛍光標識されている。この蛍光標識タンパク質と測定対象物とを混合することにより、測定対象物の存在を確認することができる（蛍光標識抗体を用いた場合の、本発明の原理を図1に示す。

- 5 測定対象物と特異的に結合する抗体(1)を蛍光色素(2)で標識した蛍光標識抗体と、測定対象物(3)とを混合することにより、測定対象物(3)の存在が確認される)。測定に必要な反応が一段階であるため、反応系を単純化することができ、測定操作を簡便にするだけでなく、測定時間を短縮することができる。

- 10 本発明の測定系では、蛍光標識タンパク質と測定対象物との結合に伴う分子量変化を、分子配向の時間的変化として測定する。そのため、測定前後の分子量変化を考慮して蛍光色素を選択することにより、種々の高分子量の測定対象物(約50万以上)、例えばウイルス以上の大きさの測定対象物(粒子として約20nm以上)を測定することができる。蛍光色素は、測定前後の分子量変化に対応する蛍光寿命を有する限り、分子量の異なる種々の測定対象物について、同一種を使用
- 15 し得る。

本発明について、以下により詳細に説明する。

本発明の蛍光偏光法によれば、上述の蛍光偏光法の原理に基づいて、試料中の測定対象物を分析(すなわち、定量、検出、または同定)することができる。

- 20 測定対象物に特異的に結合する抗体、レセプターまたはインヒビターに分類されるタンパク質(以下、特異的結合タンパク質)と蛍光色素とを共有結合させることにより、本発明の方法に有用な蛍光標識タンパク質が提供される。

- 特異的結合タンパク質は、測定対象物と所望の結合特性を有し、かつ蛍光色素との結合を可能にする官能基を有する限り、任意の抗体、レセプターまたはインヒビターに分類されるタンパク質である。その汎用性から、特に抗体が好ましい。
- 25 抗体は、その種類として、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、Fab抗体、および(Fab)<sub>2</sub>抗体を含む。いずれの種類の抗体も、本発明の方法に適用し得る。レセプターは、測定対象物が当該レセプターのリガンドとして作用する場合に使用され得る。インヒビターは、例えば、測定対象物が酵素である場合に使用され得る。



蛍光色素としては、特異的結合タンパク質が有する官能基（代表的には、一級～三級アミノ基、カルボキシル基、チオール基、フェニル基、フェノール基またはヒドロキシル基）に共有結合し得る官能基を有するものを利用する。特に、特異的結合タンパク質として抗体をはじめとしたタンパク質を使用する場合、結合効率の点から、活性化された官能基（例えば、ハロゲン化されたスルホニル基、サクシンイミド化されたカルボキシル基、またはイソチオシアネート化された一級アミノ基）を有する蛍光色素が望ましい。

標識対象物質（すなわち、特異的結合タンパク質）の1分子に対する蛍光色素の分子の結合数は、任意に変更できる。2分子以上の蛍光色素を結合させることは、検出感度を増大させ得る点で好ましい。しかし、必要以上に多くの蛍光色素を結合させると、特異的結合タンパク質の性質に悪影響を与える場合がある。例えば、抗体の親和性、溶解性などを低下させる恐れがある。従って、上記の結合数は、好ましくは10以下であり、より好ましくは1である。

使用する蛍光色素の蛍光色素骨格を選択する際は、励起波長、蛍光波長、ストークスシフト、および蛍光寿命が重要である。励起波長あるいは蛍光波長のいずれか、または両者が可視光波長領域（300nm～700nm）に存在することが好ましい。また、励起波長と蛍光波長との波長差（すなわち、ストークスシフト）は、少なくとも20nm以上であることが好ましい。蛍光色素の蛍光寿命（蛍光緩和時間）は、代表的には、約10ナノ秒から約1,000ナノ秒の範囲から選択され、好ましくは、約10ナノ秒から約200ナノ秒の範囲から選択される。約1,000ナノ秒を超えるようなあまりにも長い蛍光寿命を有する蛍光色素は、その寿命により測定対象物がどれだけ大きくても偏光度が維持され難いため、好ましくない。蛍光寿命の選択においては、測定対象物との結合による蛍光標識タンパク質の分子量変化が考慮される。その理由は、測定対象物と結合した蛍光標識タンパク質から放出される蛍光の偏光度は、分子の大きさと比例する関係にあるからである。

具体的には、分子量変化が約5,000から約50,000程度の場合（すなわち、測定対象物の分子量が数千から数万の場合）、約1から約15ナノ秒の蛍光寿命を有する蛍光色素が好ましい。このような蛍光色素の例として、シアニン、ローダミンがある。分子量変化が約50,000から約500,000程度の場合（すなわち、測定対象

物の分子量が数万から数十万の場合)、約10ナノ秒から約150ナノ秒の蛍光寿命を有する蛍光色素が好ましい。このような蛍光色素の例として、ジアルキルアミノナフタレン、ピレン誘導体がある。分子量変化が約500,000から約5,000,000程度の場合(すなわち、測定対象物の分子量が数十万から数百万の場合)、約100  
5 ナノ秒から約1,000ナノ秒の蛍光寿命を有する蛍光色素が好ましい。このような蛍光色素の例として、ピレン誘導体、金属錯体がある。

以上の観点から、好ましい蛍光色素の例として、ローダミン、ピレン、ジアルキルアミノナフタレンまたはシアニンなどの骨格を有する蛍光色素が挙げられる。特に好ましい蛍光色素は、ジアルキルアミノナフタレンまたはピレンの骨格を有  
10 する蛍光色素であり得る。

特異的結合タンパク質と蛍光色素との共有結合を形成する反応は、当業者に周知の条件に従って行うことができる。特異的結合タンパク質が一級～三級アミノ基、カルボキシル基、チオール基、フェニル基、フェノール基またはヒドロキシル基を有する場合、特異的結合タンパク質と活性化された官能基を有する蛍光色素とを、通常、室温で数時間反応させることによって、共有結合を形成させる  
15 ことができる。反応終了後、未反応の蛍光色素は常法(例えば、ゲル濾過または透析)によって容易に取り除くことができる。特異的結合タンパク質と蛍光色素とは、直接的に結合させてもよく、二官能性のリンカー分子などにより間接的に結合させてもよい。

20 上記の蛍光標識タンパク質を用いて、以下のように試料中の測定対象物を分析することができる。

測定対象物を含む試料と蛍光標識タンパク質とを溶液中で混合して、混合液中での蛍光標識タンパク質の蛍光偏光度を測定する。必要であれば、測定対象物の不在下での、蛍光標識タンパク質の蛍光偏光度もまた測定する。蛍光偏光度の測  
25 定には、任意の偏光測定装置を用い得る。測定は、穏和な温度(約10℃～約40℃)で、好ましくは一定温度で行う。

蛍光偏光度の測定は、測定対象物と蛍光標識タンパク質との混合から所定の時間後に測定してもよく、あるいは、単位時間あたりの蛍光偏光度変化を測定してもよい。測定対象物と蛍光標識タンパク質との結合が完全に終了した時点で測定

することにより、より再現性のある測定値が得られる。一方、測定対象物と蛍光標識タンパク質との結合反応の進行中における単位時間当たりの蛍光偏光度変化を測定することにより、より迅速な測定が可能になる。測定対象物を同定する目的には、既知の標準サンプルについての蛍光偏光度の測定値を、試料中の未知の測定対象物についての測定値と比較する。試料中に含まれる測定対象物を定量する目的には、既知の濃度の測定対象物を含む溶液を用いた蛍光偏光度測定により標準曲線を作成して、試料についての測定値と比較する。

本発明の蛍光偏光法により、これまで困難であった、高分子量、特に約100万以上の分子量を有するタンパク質、および細菌またはウイルスの、短時間での測定が可能である。それゆえ、本発明の方法は、特に高分子量の測定対象物を測定するのに好ましい。本発明の蛍光偏光法は、細菌またはウイルスについて、その種を同定することができる点で、特に有用である。

本発明の方法において意図される試料は、医療診断、環境測定、および食品管理を含む任意の分野における、分析が所望される測定対象物を含む材料である。医療診断用の試料の例としては、血液、リンパ液、および組織液を包含する体液が挙げられる。環境測定用の試料の例としては、土壌、河川、大気などから採取した材料が挙げられる。食品管理用の試料の例としては、ひき肉からの抽出液、まな板表面からの抽出液が挙げられる。試料は、本発明の方法に使用し得る限り、任意の形態であり得る。

本発明の方法における測定対象物は、生体内物質、微生物、ウイルス、医薬品、環境汚染物質および乱用薬物を含むが、これらに限定されない。測定対象物は、約2～3万以上の分子量、より好ましくは約10～20万以上の分子量、さらにより好ましくは約50万以上、最も好ましくは100万以上の分子量を有する高分子量の物質であることが好ましい。あるいは、約2 nm以上、より好ましくは約10 nm以上、最も好ましくは約20 nm以上の大きさを有する物質であることが好ましい。

生体内物質は、ヒトまたは他の哺乳動物の生体内に存在する任意の有機または無機物質をいう。代表的な生体内物質の例として、ペプチド、タンパク質、脂質、糖類および核酸類が挙げられる。ここで、生体内物質としてのペプチドは、約1,000未満の分子量を有するものをいう。生体内物質としてのタンパク質は、約1,0

- 00以上の分子量を有するものをいう。上記タンパク質の例としては、抗体、ホルモン、炎症マーカー、凝固因子、アポリポタンパク質、高密度リポタンパク質（HDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン、ヘモグロビン、ガンママーカーまたは酵素が挙げられる。ガンママーカーの例としては、
- 5  $\alpha$ -フェトプロテイン（AFP）、CEA、CA19-9、フェリチン、免疫抑制酸性タンパク質（IAP）、 $\beta_2$ -ミクログロブリン（BMG）、TPA、ポリアミン、ポリアミン分画、塩基性フェトプロテイン（BFP）、SCC抗原、神経特異エノラーゼ（NSE）、シアリルLe-i抗原（SLX）、CYFRA21-1、CA15-3、BGA225、エストロゲンレセプター（ER）、プロゲステロンレセプター（PgR）、5'
- 10 -ヌクレオチド・ホスホジエステラーゼアイソザイム-V（5'-NPD-V）、ビタミンK欠乏性タンパク質II（PIVKA-II）、CA19-9、エラスターゼI、CA50、Span-1、DUPAN-2、KMO 1、NCC-ST-439、CA125、CA130、CA72-4、シアリルTn抗原（STN）、SP<sub>4</sub>、free-HOG- $\beta$ 、PAP、PA、 $\gamma$ -セミノプロテイン（ $\gamma$ -Sm）などが挙げられるが、これらに限定されない。微生物は、細菌、真菌および原生動物を含む。
- 15 測定対象物として、細菌が重要であり、Enterobacteriaceae（腸内細菌）およびVibrionaceae（ヴィブリオ）がより重要であり、Enterobacteriaceae（腸内細菌）に属するサルモネラ菌および腸管出血性大腸菌ならびにVibrionaceae（ヴィブリオ）に属する腸炎ビブリオ菌が特に重要であり得る。ウイルスは、細菌ウイルス、植物ウイルス、および動物ウイルスを含む。測定対象物として、特に、Hu
- 20 man immunodeficiency virus（エイズウイルス）、Hepatitis A virus（A型肝炎ウイルス）、Hepatitis B virus（B型肝炎ウイルス）、およびHepatitis C virus（C型肝炎ウイルス）が重要であり得る。医薬品は、ヒトまたは他の哺乳動物の治療または診断のために用いられる任意の薬剤を含む。環境汚染物質は、土壌、河川、大気などから検出され得る、環境汚染の原因となる任意の物質を含む。
- 25 乱用物質は、法律または規則によりヒトによる摂取が制限された薬物であって、そのような制限に反する目的で使用されたものをいう。

本発明はまた、上記の方法における使用に適した蛍光標識タンパク質を含む試薬を提供する。蛍光標識タンパク質は、例えば、乾燥形態、緩衝液中に溶解された溶液形態など、種々の形態で提供され得る。

下記の実施例は、本発明の例示を目的とするものであって、本発明の限定を意図するものではない。

### 実施例

- 5     以下に、本発明に従って、高分子量の測定対象物である、C反応性タンパク質（CRP；分子量12万）、高密度リポタンパク質（HDL；分子量約40万）、低密度リポタンパク質（LDL；分子量300万）、および腸管出血性大腸菌0157（*E. coli* 0157；サイズ2  $\mu$ m）を測定した結果について記述する。測定には、ピレン誘導体で標識した抗CRPポリクローナル抗体、抗HDLポリクローナル抗体、  
10   抗LDLポリクローナル抗体、および抗*E. coli* 0157ポリクローナル抗体を使用した。ピレン誘導体は、約100,000から約5,000,000の分子量変化に対応した約50ナノ秒から約500ナノ秒の蛍光寿命を有する蛍光色素である。蛍光偏光度測定装置として、日立製F-4000を使用した。

#### （実施例1）

- 15   サクシンイミジル-1-ピレンブタン酸（SPB）の合成

図2に示す合成経路に従って、SPBを調製した。2.25gの1-ピレンブタン酸（7.8mmol：Molecular Probe社より入手）と1.2gのN-ヒドロキシサクシンイミド（10.4mmol：和光純薬社より入手）とを20mlのジメチルスルホキシド（DMF）に溶解した。この混合液を0℃に冷却した後、2.69gの1,3-ジクロロヘキシルカルボジイミド（13.1mmol：DCC）を添加した。その後、0℃で24時間攪拌しながら反応させた。この反応液を0.45  $\mu$ mフィルターでろ過した後、ろ液を集め、  
20   そしてエバポレータで乾燥させた。その後、95%エタノールを用いて再結晶し、1.88gのサクシンイミジル-1-ピレンブタン酸を得た（収率70%）。

得られたSPBをIR分光計およびNMRにより分析した結果、カルボキシル基の赤外吸収（1692 $\text{cm}^{-1}$ ）が消失し、イミド基の赤外吸収（1783 $\text{cm}^{-1}$ 、1785 $\text{cm}^{-1}$ 、  
25   および1817 $\text{cm}^{-1}$ ）が存在した。また、NMRの $^1\text{H}$ および $^{13}\text{C}$ の結果からもSPBであることを同定した。

#### （実施例2）

ピレン標識ポリクローナル抗体の調製

抗CRPポリクローナル抗体（バイオリアクティブ社より入手）、抗HDLポリクローナル抗体（コスモバイオ社より入手）、抗LDLポリクローナル抗体（コスモバイオ社より入手）および抗E. coli 0157ポリクローナル抗体（フナコシより入手）、ならびに上記実施例1で合成したSPBを使用して、以下に示す  
5 ようにビレン標識ポリクローナル抗体を調製した。

リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（pH7.4）中に2.0mg/mlのポリクローナル抗体を含む溶液（1000 $\mu$ l）と、ジメチルスルホキシド（DMSO）中に1.29mg/ml SPB（対抗体5倍量）で溶解した溶液（20 $\mu$ l）とをそれぞれ混合した。これらの混合液を、室温で、4時間攪拌しながら反応させた。反応液を、それぞれ、セフ  
10 アデックスG-25ゲルろ過カラム（Pharmacia）（サイズ：10 $\times$ 60mm、流速：約2ml/分）に供した。未反応のSPBを除去し、ビレン標識ポリクローナル抗体を含む画分を回収した。

回収した画分を使用して、調製したビレン標識ポリクローナル抗体の標識量および蛍光特性を評価した。

15 標識量を紫外・可視分光計（島津製、UV-1600PC）を使用して測定した結果、抗CRPポリクローナル抗体では1分子あたり1.1個、抗HDLポリクローナル抗体では1分子あたり0.9個、抗LDLポリクローナル抗体では1分子あたり0.5個、および抗E. coli 0157ポリクローナル抗体では1分子あたり1.2個のビレンが標識されていることが確認された。ビレンが抗体に結合したイメージを図3に  
20 示す。

蛍光特性を蛍光分光光度計（島津製、RF-5300PC）を使用して測定した結果、各抗体に結合したビレンの蛍光特性は、いずれの標識抗体の場合も励起波長が330nmであり、それに伴う蛍光波長が373nmと397nmであった。蛍光強度が397nmの方が強かったことから、蛍光偏光法に使用する測定条件として、励起波長を330nm  
25 とし、蛍光波長を397nmとした。

（実施例3）

ビレン標識抗CRPポリクローナル抗体によるCRPの測定

ビレン標識抗CRPポリクローナル抗体を400 $\mu$ g/mlで含む溶液（700 $\mu$ l）をキュベット（5 $\times$ 5mm）に入れ、蛍光偏光度の測定を行なった。ビレン標識抗CRPポ

リクローナル抗体についての測定条件は、測定温度：35℃、励起波長：330nm、  
蛍光波長：397nm、Gfactor：0.942とした。

- 0～50mg/dl CRP（OEM社より入手）の濃度のCRP溶液を用意した。上記  
抗体溶液（700 $\mu$ l）とCRP溶液（30 $\mu$ l）とを混合し、35℃で0.5分間攪拌した  
5 後、上記条件で0.5分間、蛍光偏光度を測定して、蛍光偏光度変化を測定した。  
その結果、CRPについては30mg/dl濃度まで測定できることが確認された。結  
果を図4に示す。

（実施例4）

ビレン標識抗HDLポリクローナル抗体によるHDLの測定

- 10 ビレン標識抗HDLポリクローナル抗体を400 $\mu$ g/mlで含む溶液（700 $\mu$ l）をキ  
ュベット（5 $\times$ 5mm）に入れ、蛍光偏光度の測定を行なった。ビレン標識抗HDLポ  
リクローナル抗体についての測定条件は、測定温度：35℃、励起波長：330nm、  
蛍光波長：397nm、Gfactor：0.943とした。

- 0～500mg/dl HDL（コスモバイオ社より入手）の濃度のHDL溶液を用意  
15 した。上記抗体溶液（700 $\mu$ l）とHDL溶液（5 $\mu$ l）とを混合し、35℃で0.5分  
間攪拌した後、上記条件で0.5分間、蛍光偏光度を測定して、蛍光偏光度変化を  
測定した。その結果、HDLについては500mg/dl濃度まで測定できることが確認  
された。結果を図5に示す。

（実施例5）

- 20 ビレン標識抗LDLポリクローナル抗体によるLDLの測定

ビレン標識抗LDLポリクローナル抗体を400 $\mu$ g/mlで含む溶液（700 $\mu$ l）をキ  
ュベット（5 $\times$ 5mm）に入れ、蛍光偏光度の測定を行なった。ビレン標識抗LDLポ  
リクローナル抗体についての測定条件は、測定温度：35℃、励起波長：330nm、  
蛍光波長：397nm、Gfactor：0.943とした。

- 25 0～1650mg/dl LDL（コスモバイオ社より入手）の濃度のLDL溶液を用意  
した。上記抗体溶液（700 $\mu$ l）とLDL溶液（5 $\mu$ l）とを混合し、35℃で0.5分  
間攪拌した後、上記条件で0.5分間、蛍光偏光度を測定して、蛍光偏光度変化を  
測定した。その結果、LDLについては1000mg/dl濃度まで測定できることが確  
認された。結果を図6に示す。

## (実施例 6)

ビレン標識抗E. coli 0157ポリクローナル抗体によるLDLの測定

5      ビレン標識抗E. coli 0157ポリクローナル抗体を400  $\mu$ g/mlで含む溶液(700  $\mu$ l)をキュベット(5 $\times$ 5mm)に入れ、蛍光偏光度の測定を行なった。ビレン標識抗E. coli 0157ポリクローナル抗体についての測定条件は、測定温度：35℃、励起波長：330nm、蛍光波長：397nm、G factor：0.942とした。

10      上記抗体溶液(700  $\mu$ l)にE. coli 0157(フナコシより入手)溶液を最終濃度が0 $\sim$ 1.2 $\times$ 10<sup>9</sup>cells/mlとなるように添加した。この混合液を、35℃で0.5分間攪拌した後、上記条件で0.5分間、蛍光偏光度を測定して、蛍光偏光度変化を測定した。その結果、E. coli 0157については1.0 $\times$ 10<sup>8</sup> cells/ml濃度まで測定できることが確認された。結果を図7に示す。

産業上の利用可能性

15      本発明の方法によって、測定反応系が単純であり、測定操作が簡便な蛍光偏光法であって、特に高分子量の物質の測定に適した蛍光偏光法が提供される。



## 請求の範囲

1. 試料中の測定対象物を分析するための蛍光偏光法であって、以下の工程：  
(a)測定対象物に特異的に結合する抗体、レセプターまたはインヒビターであるタンパク質と、蛍光色素とが共有結合した蛍光標識タンパク質を提供する工程、  
(b)該蛍光標識タンパク質を測定対象物と結合させる工程、および  
(c)測定対象物が結合した蛍光標識タンパク質の蛍光偏光度変化を測定する工程、  
を包含する、蛍光偏光法。
2. 前記抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、Fab抗体または(Fab)<sub>2</sub>抗体である、請求項1に記載の蛍光偏光法。
3. 前記測定対象物が、生体内物質、微生物、ウイルス、医薬品、環境汚染物質または乱用薬物である、請求項1に記載の蛍光偏光法。
4. 前記生体内物質が、ペプチド、タンパク質、脂質、糖類または核酸類である、請求項3に記載の蛍光偏光法。
5. 前記タンパク質が、50万以上の分子量を有する、請求項4に記載の蛍光偏光法。
6. 前記タンパク質が、抗体、ホルモン、炎症マーカー、凝固因子、アポリポタンパク質、高密度リポタンパク質(HDL)、低密度リポタンパク質(LDL)、糖化アルブミン、糖化ヘモグロビン、ヘモグロビン、ガンママーカーまたは酵素である、請求項4に記載の蛍光偏光法。
7. 前記ホルモンが、絨毛性性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体ホルモン、濾胞形成ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモンまたはインシュリンである、請求項6に記載の蛍光偏光法。
8. 前記炎症マーカーが、C反応性タンパク質(CRP)、 $\alpha$ 1-アンチトリプシン( $\alpha$ 1-AT)、 $\alpha$ 1-アンチキモトリプシン( $\alpha$ 1-X)、 $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質( $\alpha$ 1-AG)、ハプトグロビン(Hp)、セルロプラスミン(Cp)、補体第9成分(C9)、補体第4成分(C4)、補体第3成分(C3)、補体B因子(B)、フィブリノーゲン(Fbg)、血清アミロイドA(SAA)、C1

インヒビター (C 1 I)、シアロ糖タンパク質、酸可溶性タンパク質 (A S P) または免疫抑制酸性タンパク質 (I A P) である、請求項 6 に記載の蛍光偏光法。

9. 前記蛍光色素が、一級～三級アミノ基、カルボキシル基、チオール基、フェニル基、フェノール基またはヒドロキシル基に結合し得る官能基を有する、請求項 1 に記載の蛍光偏光法。

10. 前記蛍光色素の蛍光寿命が、10 ナノ秒から 200 ナノ秒の間にある、請求項 1 に記載の蛍光偏光法。

11. 前記蛍光色素が、ローダミン、ピレン、ジアルキルアミノナフタレン、またはシアニンの骨格を有する、請求項 1 に記載の蛍光偏光法。

10 12. 試料中の測定対象物を分析するための蛍光偏光法に使用するための試薬であって、測定対象物に特異的に結合する抗体、レセプターまたはインヒビターであるタンパク質と、蛍光色素とが共有結合した蛍光標識タンパク質を含む、試薬。

15 13. 試料中の細菌またはウイルスを分析するための蛍光偏光法であって、以下の工程：

(a) 該細菌またはウイルスに特異的に結合する抗体と蛍光色素とが共有結合した蛍光標識抗体を提供する工程、

(b) 該蛍光標識抗体を該細菌またはウイルスと結合させる工程、および

20 (c) 該細菌またはウイルスが結合した蛍光標識抗体の蛍光偏光度変化を測定する工程、  
を包含する、蛍光偏光法。

14. 前記抗体が、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、Fab 抗体または (Fab) 2 抗体である、請求項 13 に記載の蛍光偏光法。

25 15. 前記細菌が、Rhodospirillaceae (ロドスピリルム)、Chromatiaceae (クロマチア)、Chlorobiaceae (クロロビウム)、Myxococcaceae (ミクソコッカス)、Archangiaceae (アルカンギウム)、Cystobacteraceae (シストバクター)、Polyangiaceae (ポリアンギウム)、Cytophagaceae (サイトファーガ)、Beggiatoaceae (ベギアトア)、Simonsiellaceae (シモンシエラ)、Leucotrichaceae (リユーコトリックス)、Achromatiaceae (アクロマチウム)、Pelonemat

aceae (ペロネーマ)、Spirochaetaceae (スピロヘータ)、Spirillaceae (スピ  
 リルム)、Pseudomonadaceae (シュードモナス)、Azotobacteraceae (アゾトバ  
 クター)、Rhizobiaceae (リゾビウム)、Methylomonadaceae (メチロモナス)、  
 Halobacteriaceae (ハロバクテリウム)、Enterobacteriaceae (腸内細菌)、Vi  
 5 brionaceae (ヴィブリオ)、Bacteroidaceae (バクテロイデス)、Neisseriaceae  
 e (ナイセリア)、Veillonellaceae (ヴェイヨネラ)、Organisms oxidizing am  
 monia or nitrite (アンモニアまたは亜硝酸化細菌)、Organisms metabolizin  
 g sulfer and sulfer compounds (硫黄代謝細菌)、Organisms depositing iron  
 and/or manganese oxides (酸化鉄および/または酸化マンガン沈着細菌)、Si  
 10 derocapsaceae (シデロカプサ)、Methanobacteriaceae (メタノバクテリウム)、  
 Aerobic and/or facultatively anaerobic (好気性および/または通性嫌気性)  
 Micrococcaceae (ミクロコッカス)、Streptococcaceae (ストレプトコッカス)、  
 Anaerobic (嫌気性) Peptococcaceae (ペプトコッカス)、Bacillaceae (バチル  
 ス)、Lactobacillaceae (乳酸桿菌)、Coryneform group of bacteria (コリネ  
 15 フォルム細菌)、Propionibacteriaceae (プロピオン酸菌)、Actinomycetaceae  
 (アクチノミセス)、Mycobacteriaceae (マイコバクテリウム)、Frankiaceae  
 (フランキア)、Actinoplanaceae (アクチノプラーネス)、Dermatophilaceae  
 (デルマトフィルス)、Nocardiaceae (ノカルディア)、Streptomycetaceae  
 (ストレプトミセス)、Micromonosporaceae (ミクロモノスポラ)、Rickettsia  
 20 ceae (リケッチア)、Bartonellaceae (バルトネラ)、Anaplasmataceae (アナ  
 プラズマ)、Chlamydiaceae (クラミディア)、Mycoplasmataceae (マイコプラ  
 ズマ)、およびAcholeplasmataceae (アコレプラズマ) からなる群から選択され  
 る細菌である、請求項13に記載の蛍光偏光法。

16. 前記ウイルスが、Enterovirus (エンテロウイルス)、Cardiovirus (カ  
 25 ルディオウイルス)、Rhinovirus (ライノウイルス)、Aphthovirus (アフトウ  
 イルス)、Calicivirus (カリシウイルス)、Orbivirus (オルビウイルス)、Re  
 ovirus (レオウイルス)、Rotavirus (ロータウイルス)、Abibirnavirus (アビ  
 ビルナウイルス)、Piscibirnavirus (ピスチビルナウイルス)、Entomobirnavi  
 rus (エントモビルナウイルス)、Alphavirus (アルファウイルス)、Rubivirus

- (ルビウイルス)、Pestivirus (ペスティウイルス)、Flavivirus (フラヴィウイルス)、Influenzavirus (インフルエンザウイルス)、Pneumovirus (ニューモウイルス)、Paramyxovirus (パラミクソウイルス)、Morbillivirus (モルビリウイルス)、Vesiculovirus (ベシクロウイルス)、Lyssavirus (リッサウイルス)、Coronavirus (コロナウイルス)、Bunyavirus (ブンヤウイルス)、Arenavirus (アレナウイルス)、Human immunodeficiency virus (エイズウイルス)、Hepatitis A virus (A型肝炎ウイルス)、Hepatitis B virus (B型肝炎ウイルス)、およびHepatitis C virus (C型肝炎ウイルス) からなる群から選択されるウイルスである、請求項 13 に記載の蛍光偏光法。
- 10 17. 前記蛍光色素が、一級～三級アミノ基、カルボキシル基、チオール基、フェニル基、フェノール基またはヒドロキシル基に結合し得る官能基を有する、請求項 13 に記載の蛍光偏光法。
18. 前記蛍光色素の蛍光寿命が、10ナノ秒から200ナノ秒の間にある、請求項 13 に記載の蛍光偏光法。
- 15 19. 前記蛍光色素が、ローダミン、ピレン、ジアルキルアミノナフタレン、またはシアニンの骨格を有する、請求項 13 に記載の蛍光偏光法。
20. 前記測定対象物が細菌またはウイルスであり、前記特異的に結合するタンパク質が抗体である、請求項 12 に記載の試薬。

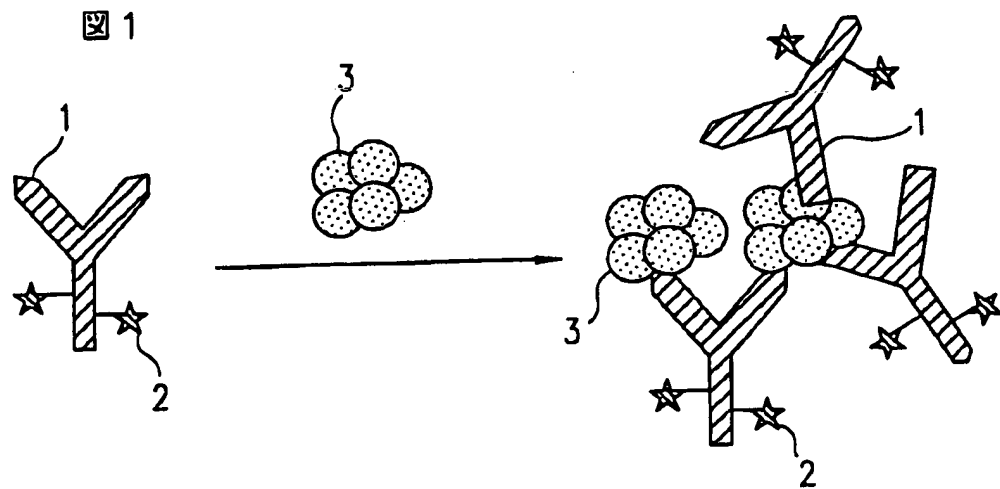


図 2

サクシンイミジル-1-ピレンブタン酸の合成経路図

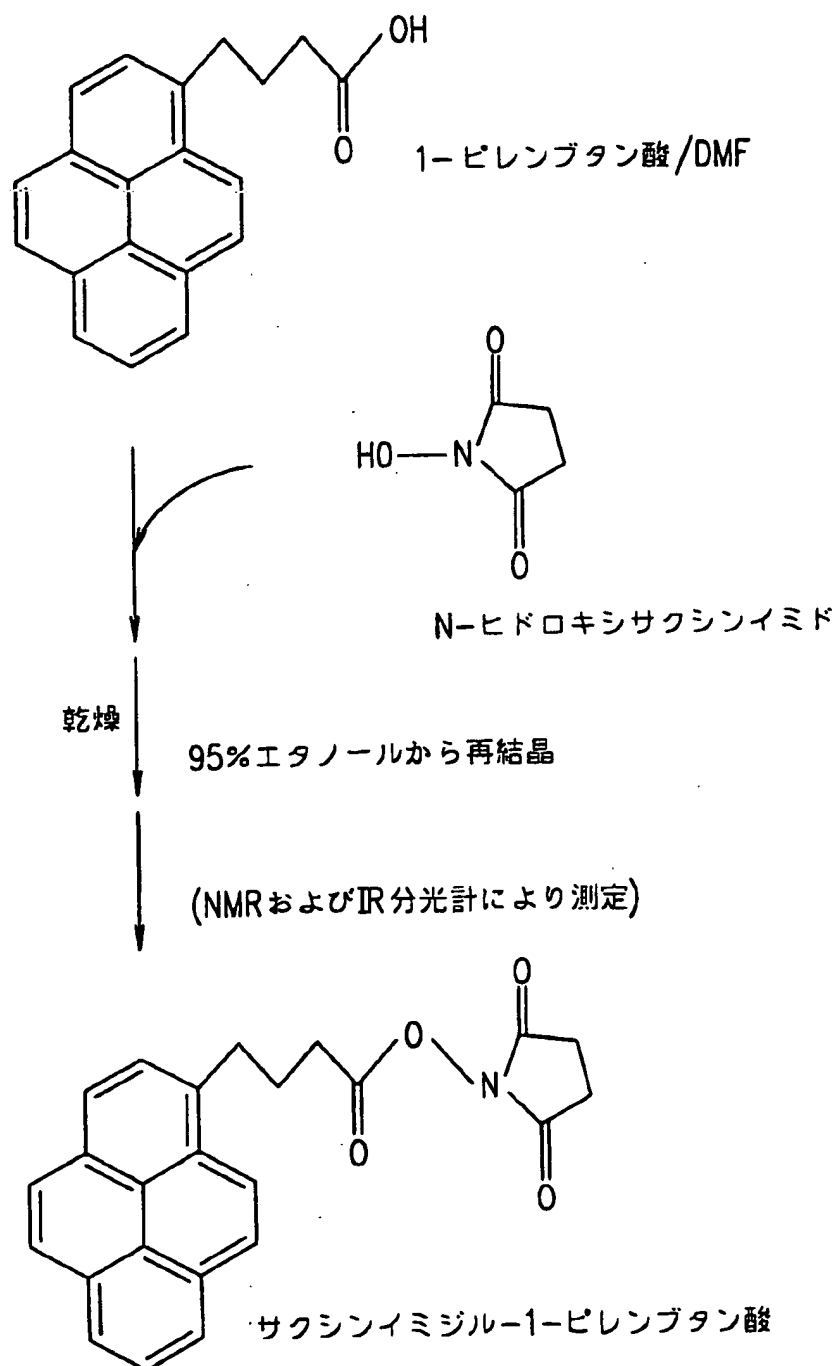


図 3

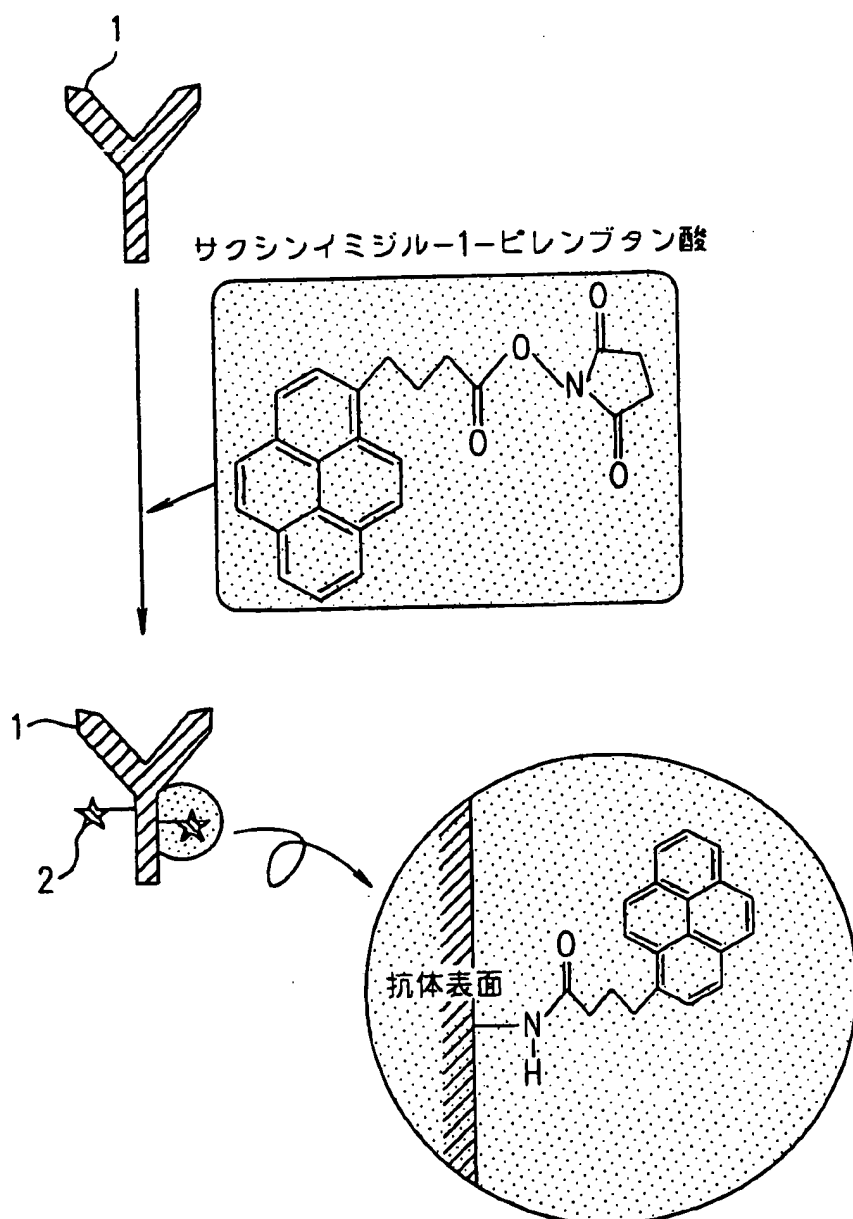


図 4

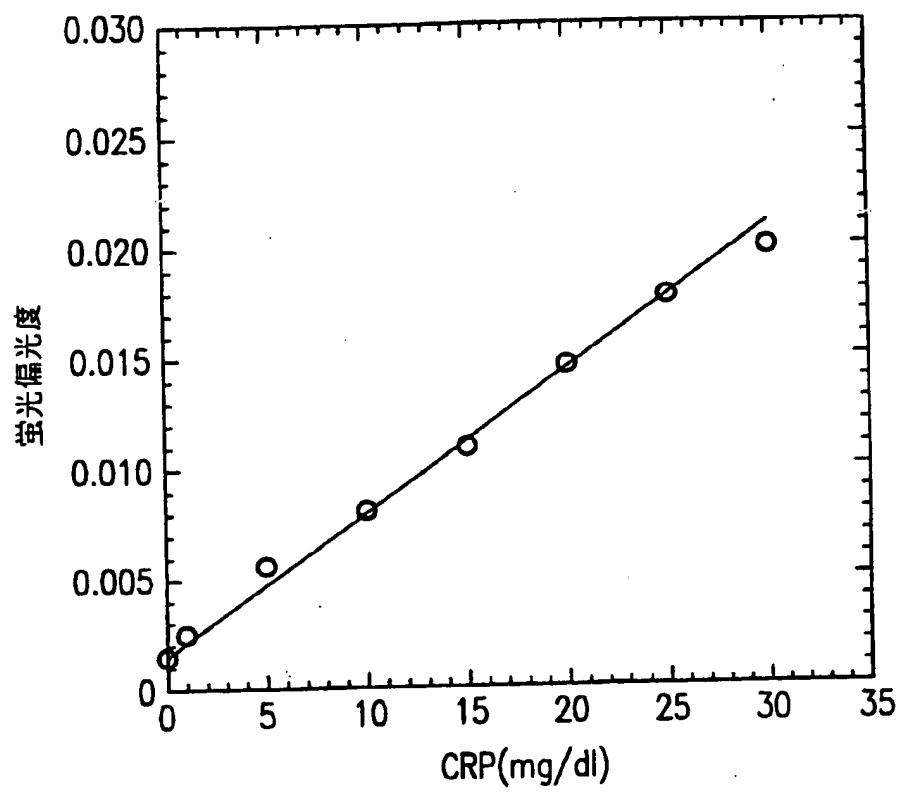




圖 5

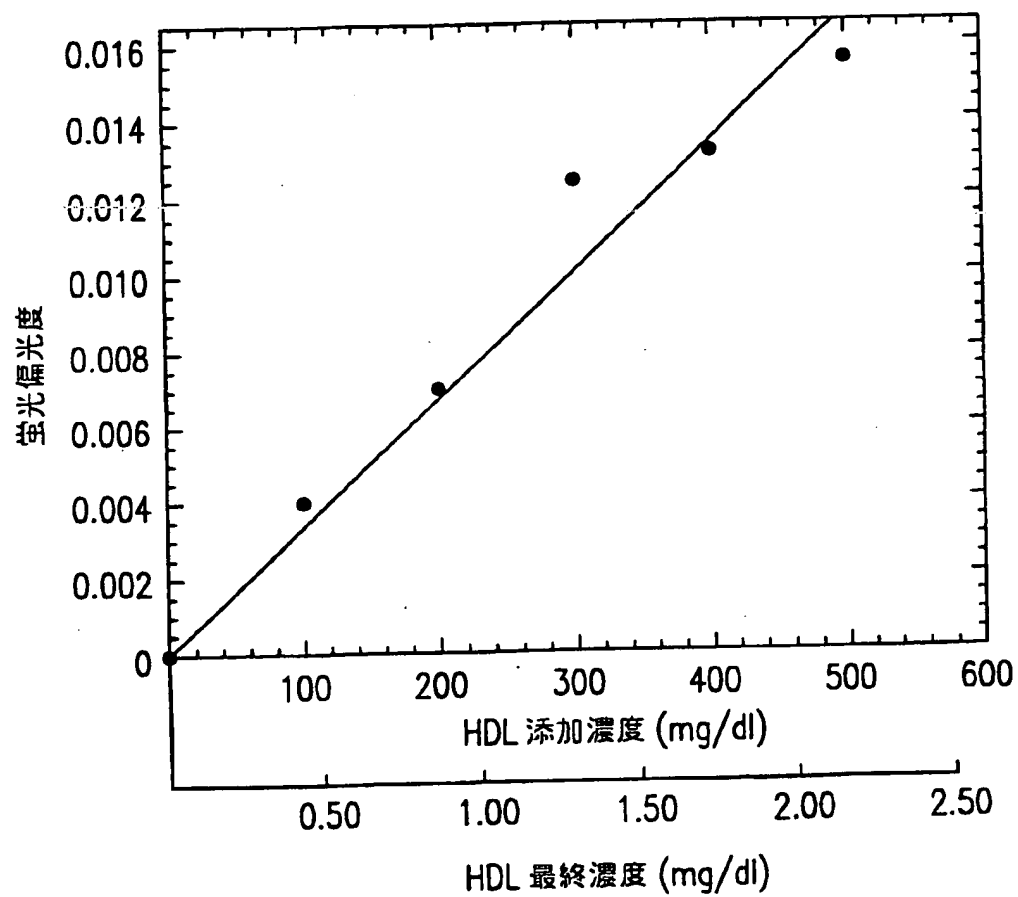


図 6

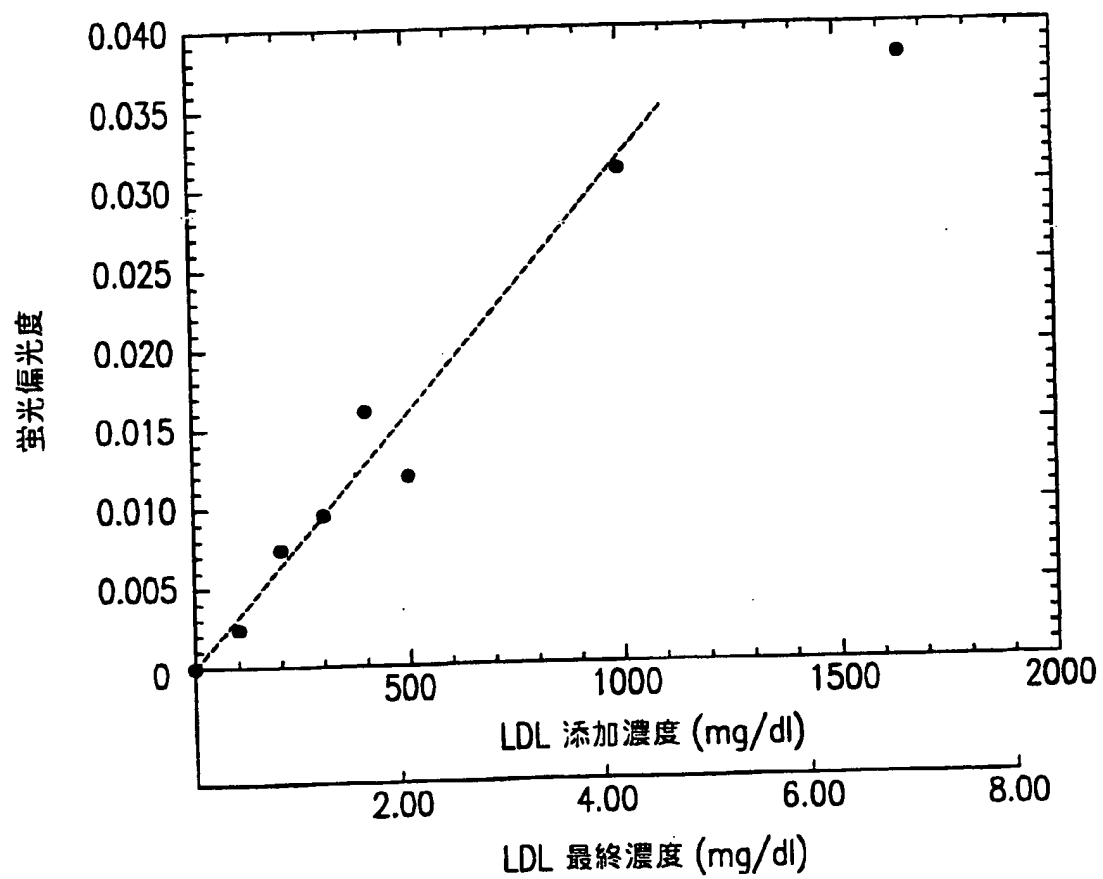


図 7

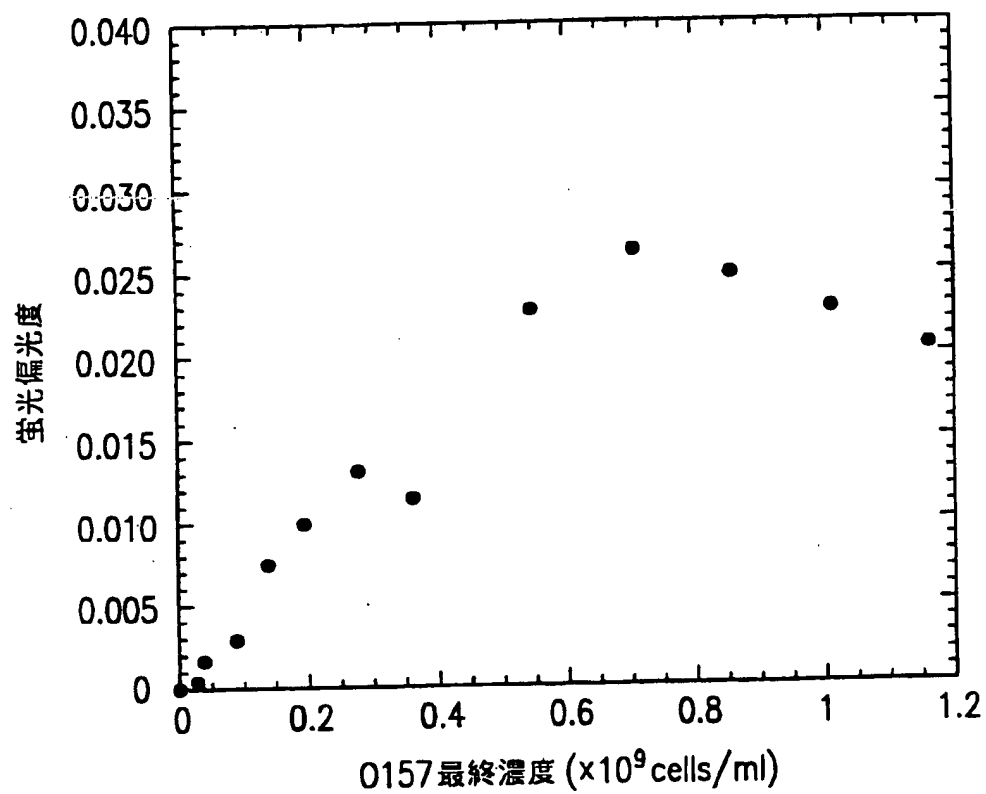


図 8

